

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

F U



DE00/363

REC'D	03 AVR. 2000
WIPO	
	PCT

Bescheinigung

Die Anmelderin Dr. Eberhard Hildt Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München in München/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Partikel zur Gentherapie“

am 5. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 24. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Aktenzeichen: 199 04 800.2

Eber

Anmelder: Dr. Eberhard Hildt
Unser Zeichen: H 1007 - hu / wd

Partikel zur Gentherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäure enthaltende Partikel, die gezielt an Zellen binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen können. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Partikel und hierfür geeignete Mittel sowie die Verwendung der Partikel zur Gentherapie.

Für eine Gentherapie ist es wichtig ein Gentransfersystem zu haben, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können. Bei Leberzellen kann dies prinzipiell mit einem modifizierten Hepatitis B-Virus (HBV) als Vektor möglich, da HBV leberzellspezifisch ist. Für andere Zellen, z.B. Fibroblasten, existiert jedoch kein Gentransfersystem, das befriedigende Ergebnisse liefert.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Gentransfersystem bereitzustellen, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß Nukleinsäure enthaltende Partikel, die ein Fusionsprotein aufweisen, welches ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid, insbesondere ein solches der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6, und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, an entsprechende Zellen binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen können. Beispielsweise hat er Nukleinsäure enthaltende HBV-Partikel hergestellt, die an Fibroblasten binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen. Hierzu hat er die Hepatocyten-Bindungsstelle, die in der Region PreS1, insbesondere zwischen den Aminosäuren 21-47, des großen Oberflächenproteins von HBV (LHBs) vorliegt, gegen die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungs-

stelle von Fibronektin ausgetauscht, wobei das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid, das in der Region PreS2 von LHBs vorliegt, erhalten blieb. Ferner hat er Partikel mit Fibroblasten-Spezifität hergestellt, indem er das Core-Protein von HBV (HBcAg) mit der $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronektin und dem vorstehenden Zellpermeabilität-vermittelnden Peptid verbunden hat. Des Weiteren hat er erkannt, daß die in den Partikeln enthaltene Nukleinsäure in den Zellen exprimiert wird.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, Partikel bereitzustellen, umfassend:

- (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und
- (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.

Der Ausdruck "Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid" umfaßt jegliche Peptide, die Substanzen, insbesondere Proteine, eine Zellpermeabilität vermitteln können. Dies sind insbesondere jene Peptide, die in der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6 des Anmelders genannt sind. Besonders bevorzugt ist ein Peptid, das die folgende Aminosäure-(DNA)-Sequenz umfaßt:

P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT

Der Ausdruck "zellspezifische Bindungsstelle" umfaßt jegliche Bindungsstellen von Proteinen und sonstigen kleinen Molekülen, über welche die Proteine bzw. die Moleküle an Zellen binden können. Beispiele solcher Bindungsstellen finden sich in Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Ferner finden sie sich in Liganden von Hormon-, Neurotransmitter-, Blutzellenoberflächen- und Integrin-Rezeptoren.

Eine bevorzugte Bindungsstelle ist die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin. Diese wird nachstehend mit RGD bezeichnet und umfaßt die Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat.

Der Ausdruck "Virus" umfaßt DNA- und RNA-Viren, insbesondere Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Vaccinia-viren, Baculoviren, Hepatitis C-Viren, Hepatitis A-Viren, Influenzaviren und Hepadna-Viren. Beispiele letzterer sind HBV, WHV ("woodchuck hepatitis virus") GSHV ("ground squirrel hepatitis virus"), RBSHV ("red-bellied squirrel hepatitis virus") DHV ("Pekin duck hepatitis virus") und HHV ("heron hepatitis virus"), wobei HBV bevorzugt ist.

Der Ausdruck "Virus-Protein" betrifft jegliches Protein eines vorstehenden Virus, das als ganzes oder teilweise in einem Fusionsprotein zusammen mit einem Zellpermeabilität-vermittelnden Peptid und einer heterologen zellspezifischen Bindungsstelle in Form eines weiteren Peptids vorliegen kann. Das Protein kann auch bereits das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid enthalten. Ein Beispiel für ein solches Protein ist LHBs. Dieses wird wie andere Oberflächen-Proteine und Core-Proteine, z.B. HBcAg, bevorzugt. Der Ausdruck "heterolog" weist darauf hin, daß das Protein von Natur aus nicht die vorstehende zellspezifische Bindungsstelle aufweist. Günstig kann es sein, wenn die homologe, d.h. von Natur aus vorliegende Bindungsstelle des Proteins ausgeschaltet ist. Besonders günstig kann es sein, wenn die homologe durch die heterologe Bindungsstelle ersetzt ist.

Der Ausdruck "Nukleinsäure" umfaßt RNA und DNA, wobei beide einzelsträngig und/oder doppelsträngig sein können.

Der Ausdruck "Virus-spezifisches Verpackungssignal" weist auf eine Signalsequenz in vorstehender Nukleinsäure hin, mittels dieser die Nukleinsäure in die Proteinhülle eines Partikels verpackt wird. Die Signalsequenz ist spezifisch für ein vorstehendes Virus. Eine bevorzugte Signalsequenz ist jene von HBV. Diese findet sich auf der HBV-DNA und wird in der Literatur mit Epsilon bezeichnet.

Der Ausdruck "Struktur-Gen" umfaßt Gene, die für Polypeptide (Proteine) kodieren. Beispiele von Polypeptiden sind Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Cytokine, wie IL-2 und GM-CSF, und kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, Tumor-assoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden und Hormone sein. Ferner umfaßt der Ausdruck "Struktur-Gen" Antisense-Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren, Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren und Ribozyme.

Erfindungsgemäß werden Partikel bevorzugt, die ein Fusionsprotein enthalten, das ein LHBs oder Fragmente davon und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Günstig ist es, wenn die heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, anstelle der homologen Bindungsstelle vorliegt. Besonders bevorzugt ist es, wenn das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist.

Des weiteren werden Partikel bevorzugt, die ein Fusionsprotein enthalten, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid, z.B. ein solches der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6, insbesondere mit der vorstehend angegebenen Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Besonders bevorzugt ist es, wenn das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" weist darauf hin, daß diese Aminosäuresequenz ein Fu-

sionsprotein kennzeichnet, das vergleichbare Elemente und Funktionen wie das Fusionsprotein von Fig. 1 oder Fig. 2 aufweist, sich allerdings bis zu 20 %, vorzugsweise 10 %, von der Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder 2 unterscheidet.

Ein erfindungsgemäßes Partikel kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Enthält das Partikel z.B. ein Fusionsprotein, das ein LHBs umfaßt, in dem die homologe durch eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, ersetzt ist, so ist ein Verfahren günstig, das folgende Verfahrensschritte aufweist:

- (a) Co-Transfektion von Zellen, die für ein Hepatitis B-Virus-Genom kodieren, wobei diese kein LHBs exprimieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein LHBs umfaßt, in dem die homologe durch eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, ersetzt ist, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein viruspezifisches Verpackungssignal und ein StrukturGen aufweist, und
- (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

Enthält das Partikel ein Fusionsprotein, das ein HBcAG, ein Zellpermeabilitätsvermittelndes Peptid gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 50718.6, insbesondere jenes mit vorstehender Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt, so ist ein Verfahren günstig, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

- (a) Co-Transfektion von Zellen, die für eine HBV-Polymerase kodieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilitätsvermittelndes Peptid gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 50718.6, insbesondere jenes mit vorstehender Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt, und mit einem zweiten

Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

(b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

Hinsichtlich der Ausdrücke "Expressionsvektor", "Zellen", und "Isolierung und Reinigung" wird auf nachstehende Ausführungen, insbesondere in den Beispielen, verwiesen. Die Zellen stellen ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar. Bezuglich der anderen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das ein LHBs oder Fragmente davon und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Vorzugsweise umfaßt das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Vorzugsweise umfaßt das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

Hinsichtlich des Ausdrucks "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Fusionsprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

(a) Die DNA von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" weist darauf hin, daß diese DNA für ein Fusionsprotein kodiert, das vorglehbare Elemente und Funktionen wie das Fusionsprotein von Fig. 1 oder 2 aufweist, sich allerdings von der Basensequenz von Fig. 1 oder 2 derart unterscheidet, daß in der Aminosäuresequenz ein Unterschied von maximal 20 %, vorzugsweise 10 %, vorliegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in einem Vektor vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV und pRK5 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E.coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 und M15pRep4, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Hep62, CCL13 und 293, die Insektenzellen Sf9 und Sf21 und die Pflanzenzellen *Lupinus albus*.

Der Fachmann kennt Verfahren und Bedingungen Zellen mit einem, die erfindungsgemäße DNA enthaltenden Expressionsvektor zu transformieren bzw. transfizieren und die Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Virus-Protein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit dem Fusionsprotein zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können ebenfalls mit dem Fusionsprotein erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein,
- (b) eine erfindungsgemäße DNA,
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Gentransfer-System bereit, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können. Die Zellen können einzeln oder in einem Gewebe vorliegen. Ferner können die Zellen isoliert oder im Körper eines Individuums vorliegen. Somit eignet sich die vorliegende Erfindung für eine ex vivo bzw. in vivo Gentherapie von Zellen bzw. Geweben. Die Anwendung der vorliegenden Erfindung kann dabei durch erfindungsgemäße Antikörper überwacht und gesteuert werden.

Somit stellt die vorliegende Erfindung einen großen Schritt dar gentherapeutische

Veränderungen an Zellen bzw. Geweben gezielt durchzuführen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das ein LHBs und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt, wobei diese die homologe ersetzt.

Fig. 2 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid der vorstehenden Aminosäuresequenz und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Partikels, das ein Fusionsprotein enthält, welches ein LHBs und eine heterologe Bindungsstelle umfaßt.

(A) Herstellung eines Expressionsvektor, der für sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs kodiert.

Hierzu wird von dem Plasmid pTKTHBV2 (vgl. Will et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985), 891-895) ausgegangen. Dieses enthält zwei Kopien des HBV-Genoms. In einer ersten PCR wird ein Fragment von ntHBV2821 (erste Kopie) bis ntHBV2870 (zweite Kopie) amplifiziert. Der forward Primer (nt 2821-2855) weist folgende Sequenz auf: CCA TAT TCT TGG GAA CAA GAT ATC CAG CAC GGG GC. Eine EcoRV-Schnittstelle ist unterstrichen. Das Triplet CAC zwischen nt 2849-2852 ersetzt das ATG-Startcodon von LHBs. Der backward Primer (nt 2877-2845) weist folgende Sequenz auf: GGA TTG CTG GTG GAA GAT ATC

- 10 -

TGC CCC GTG CTG. Eine EcoRV-Schnittstelle ist unterstrichen. Das Triplet CGT zwischen nt 2852-2849 ersetzt das natürliche Triplet CAT. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit EcoRV verdaut und über ein präparatives 1%iges Agarosegel gereinigt. Ein Fragment der Größe von ca. 3,3 kb wird aus dem Gel eluiert und aufbewahrt.

In einer zweiten PCR werden ein forward Primer, der eine EcoRV-Schnittstelle gefolgt von der nachstehenden Sequenz ntHBV2860 (zweite Kopie)-2878 (erste Kopie) (CAG CAC GGG GCA GAT ATC TTC CAC CAG CAA TCC) aufweist, und ein backward Primer verwendet, der eine EcoRV Schnittstelle gefolgt von der nachstehenden Sequenz ntHBV 2830-2810 (GC CCC GTG CTG GAT ATC ATC TTG TTC CCA AGA ATA TGG) aufweist. Erhaltende PCR-Fragmente werden mit EcoRV verdaut und über ein präparatives 1 % Agarose-Gel gereinigt. Ein Fragment der erwarteten Größe wird aus dem Gel eluiert und dephosphoryliert. Dieses Fragment wird mit dem vorstehenden ca. 3.3 kb großen in eine Ligasereaktion eingesetzt, wodurch der HBV-Expressionsvektor pTKTHBV2Ldef erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs.

(B) Herstellung eines Expressionsvektors, der für ein Fusionsprotein kodiert, welches ein LHBs und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt.

Ausgehend von dem Plasmid pTKTHBV2 (vgl. vorstehend) wird das Fragment ntHBV2990-834 durch PCR amplifiziert. Der 5'-Primer weist folgende Sequenz auf: AAA AGA TCT GGC CGT GGC GAA GGA GCT GGA GCA TTC. Diese umfaßt eine BgIII-Schnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und der für das Tripeptid RGD-kodierenden Sequenz. Der PreS1-spezifische Leserahmen wird genutzt. Der 3'-Primer wiest die folgende Sequenz auf: AAA AGA TCT GGT TTA AAT GTA TAC CCA AAG. Diese umfaßt eine BgIII-Schnittstelle. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BgIII verdaut und in den mit BgIII-gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA.3 (Invitrogen) inseriert, wodurch der Ex-

pressionsvektor pCRGDLHBs erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für ein N-terminal verkürztes LHBs, das die RGD-Bindungsstelle umfaßt.

(C) Herstellung eines ein Struktur-Gen und ein Verpackungssignal aufweisenden Expressionsvektors

Es wird eine für das HBV-Verpackungssignal Epsilon kodierende Sequenz, z.B. ntHBV 1840-1914, mittels PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wird eine EcoRV-Schnittstelle eingeführt. Die Sequenz des forward Primers lautet: CCC GAT ATC ATG TCA TCT CTT GTT CAT GTC CTA. Die Sequenz des backward Primers lautet: GGG GAT ATC GGT CGA TGT CCA TGC CCC AAA. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit EcoRV gespalten und in den mit EcoRV gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA.3 (vgl. vorstehend) inseriert, wodurch der Vektor pcVPHBV erhalten wird. Dieser Vektor enthält das HBV-spezifische Verpackungssignal Epsilon.

Ausgehend von dem Vektor pCeGFP (Invitrogen), der für ein "green fluorescent protein" unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodiert, wird die den CMV-Promotor und das GFP-Gen enthaltende Sequenz mittels PCR amplifiziert. Der forward Primer hat folgende Sequenz: GGG GGA TCC CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC GCG TTG. Der backward Primer hat folgende Sequenz: GGG GGA TCC GCG GCC GCT TTA CTT GTA. Die verwendeten Primer enthalten jeweils eine BamHI-Schnittstelle. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BamHI gespalten und in den mit BamHI gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCVPHBV (Invitrogen) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCVPHBVeGFP erhalten wird. Dieser Expressionsvektor enthält das HBV-spezifische Verpackungssignal Epsilon, den CMV-Promotor und eine für eGFP kodierende Sequenz.

(D) Herstellung einer Verpackungzelllinie

Etwa 0.8×10^6 HepG2-Zellen werden mit 4 μ g von pTKTHBV2Ldef (vgl. (A)) und 2 μ g pCDNA.3 (vgl. (B)) mittels Lipofektion transfiziert. pCDNA.3 kodiert für

G418 Resistenz. 2h nach Transfektion werden die Zellen in ein 700 mg G418/Inthaltend s Medium überführt. G418 resistente Klone werden nach 14d subkultiviert. Die stabile Integration von pTKTHBV2Ldef wird mittels PCR und Southern Blots nachgewiesen. Die Expression des Oberflächenproteins SHBs von HBV und von HBcAg wird mittels spezifischer Antikörper in ELISAS nachgewiesen. Es wird die Verpackungszelllinie HepG2-TKTHBV2Ldef erhalten. Diese Zelllinie exprimiert sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs.

(E) Herstellung erfindungsgemäßer Partikel

Etwa 0.8×10^6 Zellen der Verpackungszelllinie von (D) werden mit $3\mu\text{g}$ von pCRGDLHBs (vgl. (B)) und $3\mu\text{g}$ von pCVPHBVeGFP (vgl. (B)) mittels Lipofektion transzidiert. 72 h nach Transfektion werden die Zellen bzw. deren Überstände gesammelt und einer PEG-Fällung unterworfen. Anschließend wird eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Es werden erfindungsgemäße Partikel in reiner Form erhalten. Diese Partikel umfassen sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs, das durch ein RGD-LHBs ersetzt ist.

Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Partikels, das ein Fusionsprotein enthält, welches ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe Bindungsstelle umfaßt.

Es wird eine für ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid (nachstehend mit ZPP bezeichnet) kodierende DNA verwendet. Diese hat folgende Sequenz: XXX AGA TCT ATG CCC ATA TCG TCA ATC TTC TCG AGG ATT GGG GAC CCT GGA TCC XXX (X bezeichnet ein beliebiges Nukleotid). Diese weist am 5'-Ende eine BglII-Schnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und an ihrem 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle auf. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das auf vorstehender Sequenz basiert, wird mit BamHI/BglII geschnitten und in den mit BamHI-gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pCDNA.3 (vgl. vorstehend) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCZPP erhalten wird.

Ferner wird der Expressionsvektor pTKTHBV2 (vgl. vorstehend) verwendet, um das Fragment nt-HBV 1861-2136 mittels PCR zu amplifizieren. Der forward-Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GGA TCC ACT GTT CAA GCC TCC AAG CTG. Diese umfaßt eine BamHI-Schnittstelle gefolgt von der Sequenz ntHBV^Z 1861-1881. Der backward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GAA TTC TGG ATC TTC CAA ATT AAC ACC CAC CCA. Diese umfaßt eine EcoRI-Schnittstelle gefolgt von der Sequenz ntHBV 2139-2116. In einer zweiten PCR wird das Fragment ntHBV 2140-2480 amplifiziert, das an seinem 5'-Ende mit der für das RGD-Motiv kodierenden Sequenz erweitert ist. Der forward-Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GAA TTC CGA GGC GAC GCG TCT AGA GAC CTA GTA GTC. Diese umfaßt eine EcoRI-Schnittstelle gefolgt von der für das RGD-Motiv kodierenden Sequenz und der Sequenz ntHBV 2140-2161. Der backward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX AAG CTT TCC CCA CCT TAT GAG TCC AAG. Diese umfaßt eine HindIII-Schnittstelle und die Sequenz ntHBV 2480-2460.



Erhaltene Fragmente beider PCRs werden mit EcoRI gespalten und miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wird als Template für eine weitere PCR verwendet, wobei als forward Primer jener der ersten PCR und als backward Primer jener der zweiten PCR verwendet werden. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BamHI-/HindIII gespalten und in den mit BamHI/HindIII-gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCZPP inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCZPPHBcRGC erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für HBcAg, das N-terminal die ZPP-Sequenz und im Bereich der Aminosäuren 79-82 die RGD-Sequenz enthält.

Des weiteren werden etwa 0.8×10^6 HepG2-Zellen mittels Lipofektion mit 4 µg eines für HBV-Polymerase kodierenden Expressionsvektors und mit 2 µg pCDN3 transfiziert. Es wird auf die vorstehende Beschreibung von Beispiel 1, (D) verwiesen. Es wird eine mit HepG2-HBV Pol bezeichnete Zelllinie erhalten.

Etwa 0.8×10^6 Zellen der Zelllinie HepG2-HBV Pol werden mit 3 µg von pCZPPHBcRGC und 3 µg von pCVPHBVeGFP (vgl. Beispiel 1, B) mittels Lipofektion trans-

fizi rt. Es wird auf vorsteh nde Beschreibung von Beispiel 1,(E) verwiesen. Es werden erfindungsgem äße Partikel in reiner Form erhalten.

Beispiel 3: Nachweis der Expression einer in erfindungsgem äßen Partikeln vorliegender Nukleinsäure in Fibroblasten

Etwa 1×10^9 erfindungsgem äße Partikel von Beispiel 1 (E) bzw. Beispiel 2, werden in $100\mu\text{l}$ 0,9 % Saline gelöst und in die Schwanzvene von balb/c Mäusen injiziert. 48 h nach Injektion wird der Soleus- und der Tibialis anterior Muskel isoliert und in einem "tissue tag" langsam eingefroren. Aus den eingefrorenen Präparaten werden Kryoschnitte angefertigt und diese unter einem Fluoreszenzmikroskop bei Blauanregung analysiert.

Es wird eine grüne Fluoreszenz in den Fibroblasten erhalten, was die Expression des "green fluorescent protein" zeigt.

Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgem äßen Fusionsproteins

Es wird das erfindungsgem äße Fusionsprotein von Fig. 1 hergestellt. Hierzu wird die DNA von Fig. 1 am 5'-Ende mit einem BgIII-Linker und am 3'-Ende mit einem BgIII-Linker versehen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgespalten. Das erhaltene BgIII/BgIII-Fragment wird in den BamHI-gespaltenen Expressionsvektor pQE8 inseriert, so daß das Expressionsplasmid pQE8/LHBs erhalten wird. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgem äßen Fusionsprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/LHBs wird zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit $100\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und $25\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin kultiviert und 4 h mit $60\mu\text{M}$ Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine

Lyse der Bakterien erfolgt, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 %-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein vom Beispiel 4 wird einer 18 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine 38-kD-Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gelstücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel gereinigten Fusionspolypeptid werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
- Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
- Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfundungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfundungsgemäß, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfundungsgemäß, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
- Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
- Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Partikel, umfassend:
 - (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und
 - 5 (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.
2. Partikel nach Anspruch 1, wobei das Virus-Protein von einem Adenovirus, Adeno-assozierten Virus, Vaccinia-virus, Baculovirus oder Hepadna-Virus stammt.
3. Partikel nach Anspruch 2, wobei das Hepadna-Virus ein Hepatitis B-Virus ist.
- 15 4. Partikel nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Virus-Protein ein Oberflächenprotein ist.
5. Partikel nach Anspruch 4, wobei das Oberflächenprotein ein LHBs ist.
6. Partikel nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Virus-Protein ein Core-Protein ist.
7. Partikel nach Anspruch 6, wobei das Core-Protein ein HBcAg ist.
- 25 8. Partikel nach einem der Ansprüche 1-7, wobei das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

9. Partikel nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die heterologe zellspezifische Bindungsstelle RGD ist.

10. Partikel nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das Fusionsprotein jenes
5 von Fig. 1 oder 2 ist.

11. Verfahren zur Herstellung des Partikels nach Anspruch 1, wobei das Fusionsprotein ein LHBs und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle enthält, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

10 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für ein Hepatitis B-Virus-Genom kodieren, wobei diese kein LHBs exprimieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein LHBs und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

15 (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

20 12. Verfahren zur Herstellung des Partikels nach Anspruch 1, wobei das Fusionsprotein ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle aufweist, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

25 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für eine HBV-Polymerase kodieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Ver-

30 packungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

(b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

13. Fusionsprotein, umfassend ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle.
14. Fusionsprotein nach Anspruch 13, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.
15. DNA, kodierend für das Fusionsprotein nach Anspruch 13.
- 10 16. DNA, kodierend für das Fusionsprotein nach Anspruch 14, umfassend:
 - (a) Die DNA von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, oder
 - 15 (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten gentischen Code verwandte DNA.
17. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 16.
- 20 18. Verwendung des Partikels nach einem der Ansprüche 1-10 zur Gentherapie von Zellen und Geweben.

H 1007

**Zusammenfassung
Partikel zur Gentherapie**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Partikel, umfassend:

10 (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und

(b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.

15 Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Partikel und hierfür geeignete Mittel sowie die Verwendung der Partikel zur Gentherapie.

atggccgtggcgaaggagctggag
cattcgggct gggttcacc ccaccgcacg gaggccttt ggggtggagc
cctcaggctcaggcatact acaaacttg ccagcaaatc cgcctcctgc ctccaccaat
cgccagacaggaaggcagcc taccggcgtg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag
gccatgcagtggattccacaa ccttcacca aactctgcaa gatcccagag
tgagaggcct gtattccctgctggct ccagttcagg agcagtaaac cctgttccga
ctactgcctc tcccttatcgtcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg
agaacatcac atcaggatcttaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg ttttcttgc
tgacaagaat cctcacaataccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctaaatttc
tagggggAAC taccgtgtcttggccaa attcgcagtc cccaaacctcc aatcaactcac
caaccctcctg tcctccaacttgcctgggtt atgcgtggat gtgtctgcgg cgtttatca
tcttcccttt catcctgctgtatgcctca tcttcttgc gggttcttcg gactatcaag
gtatgttgcg cgtttgcctctaattccag gatcctcaac caccagcagc ggaccatgcc
gaacctgcatt gactactgctcaaggaacct ctatgtatcc ctccgttgc tgtaccaaacc
cttcggacgg aaattgcacctgtattccca tcccatcatc ctggccttc ggaaaattcc
tatggagtg ggcctcagccggttctccct ggctcagttt actagtgcca ttgttgcgt
ggttcgtagg gctttccccactgtttggc tttcagttat atggatgatg tggatttggg
ggccaagtct gtacagcatttgagtccct ttttaccgct gttaccaatt ttctttgtc
tttgggtata cattaaacc

MGRGDGAG AFGLGFTPPHGGLLGWSPQA QGILETL PAN PPPASTNRQS
GRQPTPLSPP LRNTHPQAMQ WNSTTFHQTLQDPRVRGLYF PAGGSSSGTV
NPVPTTVSPI SSIFSRIGDP ALNMENITSG FLGPLLVLQAGFFLLTRILT
IPQSLDSWWT SLNFLGGTTV CLGQNSQSPT SNHSPTSCPP
TCPGYRWMCLRRFIIFLFIL LLCLIFLLVL LDYQGMLPVC PLIPGSSTTS
TGPCRTCTTP AQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIPIPSSWA FGKFLWEWAS
ARFSWLSLLV PFVQWFVGLS PTVWLSVIWMMWYWGPSLYS ILSPFLPLLP
IFFCLWVYI

Figur 1

atg ccc ata tcg tca atc ttc tcg agg att ggg gac cct gga tcc act
actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgaccctat
aaagaatttg gagctactgt ggagttactc tcgttttgc cttctgactt ctttccttca
gtacgagatc ttcttagatac cgccctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag
cattgttac ctcaccatac tgcactcagg caagcaattc tttgcttgggg ggaactaatg
actctagcta cctgggtggg tggtaatttg gaagatcca gaa ttc cgaggcgac gcg
tctagaga cctagtagtcagttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac
tcttgggtt tcacatttcttgcactt ttggaagaga aaccgttata gagtatttgg
tgtcttcgg agtgtggattcgactc cagcttata tag accaccaa at gcccctatcc
tatcaacact tccggaaactactgttggta gacgacgagg caggtccctt agaagaagaa
ctccctcgcc tcgcagacgaaggctcaat cgccgcgtcg cagaagatct caatctcgaa
aacctcaatg ttagtattcc

MPLSSIFSRIGDPTVQASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGATVEL
LSFLPSDFFPSVRDLLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLAT
WVGVNLEDPEFRGDAASRDLVVSYVNTNMGLKFRQLLWFHISCLTFGRETVIEYLV
SFGVWIRTPPAYRPPNAPISTLPETTVVRRRGRSPPRRTPSPRRRSQSPRR
RSQSREPQC"

Figur 2